

مقاله پژوهشی

تعیین خصوصیات بیولوژیکی جدایه‌های ویروئید کاککسیای مرکبات در باغات نارنگی محلی
(*Citrus unshiu* Marcovitch) در شرق مازندران

پرسا تیموری^۱، سعید نصرالله نژاد^۱، سید وحید علوی^۲، میثم تقی نسب^۱

۱- به ترتیب دانشجوی دکتری، دانشیار و دانش آموخته کارشناسی ارشد گروه گیاهپزشکی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،

گرگان، ایران؛ ۲- دانشیار بخش تحقیقات گیاهپزشکی مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی مازندران، سازمان تحقیقات،

آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران

(تاریخ دریافت: مرداد ۱۴۰۱؛ تاریخ پذیرش: آبان ۱۴۰۱)

چکیده

در سال‌های اخیر علائم مشکوک به بیماری ویروئیدی کاککسیای مرکبات (*Citrus cachexia viroid*) شامل آبله دوکی و وجود صمغ درحفره‌های تنه در باغات مرکبات مازندران شیوع زیادی یافته است. این پژوهش به منظور تفکیک بیولوژیکی این ویروئید در باغات نارنگی محلی منطقه انجام شد. پس از نمونه برداری، بررسی با روش خالص سازی ستون کروماتوگرافی پودرسلولز CF-11 و RT-PCR با آغازگرهای اختصاصی انجام شد. برای تفکیک سویه‌های ویروئید، روی ۱۳ رقم از نهال‌های بذری، پیوند پستی انجام شد. نتایج نشان داد از مجموع ۱۵۰ نمونه جمع‌آوری شده، ۹ نمونه فقط به ویروئید کاککسیا آلوده بودند و سایر نمونه‌ها دارای آلودگی مخلوط با ویروس‌های تریستزا، پسرروز و ویروئید آگزوکورتیس بود. نتایج بررسی‌های گلخانه‌ای نشان داد که بهترین گیاه محک برای تفکیک سویه‌های شدید و خفیف ویروئید کاککسیای مرکبات، رقم لیموی مکزیکی است. همچنین تفکیک سویه‌های شدید و خفیف، بر اساس علائم درختان نارنگی محلی امکان‌پذیر بوده و اندازه و شکل آبله‌های روی تنه در محل پیوند و صمغ زدگی زیر پوست، می‌تواند مبنای اولیه تفکیک آنها از یکدیگر قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: گیاه محک، لیموترش مکزیکی، ویروئید کاککسیای مرکبات، RT-PCR

Biological characteristics of *Citrus cachexia viroid* isolates in local tangerine orchards
(*Citrus unshiu* Marcovitch) in East Mazandaran

P. TEYMURI¹, S. NASROLLANEJAD¹, V. ALAVI², M. TAGHINASAB¹

1. PhD student, Associated Professor and former MSc student respectively, Department of Plant protection, Gorgan University of Agricultural

2. Department of Plant Protection, Mazandaran Agricultural and Natural Resources Research Center, Sari, Iran

Abstract

In recent years symptoms of viroid diseases, include stem pitting and gumming have highly incidenced in citrus orchards of Mazandaran. This study was conducted for determining the biological characteristics of *Citrus cachexia viroid* strains in local tangerine orchards. 150 samples were collected from three important infected districts. Purification was carried out in CF-11 column. Presence of viroid was confirmed with RT-PCR using specific primers. For differentiation of Cachexia viroid isolates, 13 types of citrus were bark grafted on rootstock and symptoms were observed. RT-PCR data showed that 6% of samples were infected only with cachexia, while other samples showed mix infection with exocortis, tristeza and psorosis. According to the assay, the best indicator plant is the Mexican lime (*Citrus aurantifolia*. Swing.), which could express the typical symptoms of mild to severe infection. Also it is possible to separate severe strains from mild strains based on the symptoms on the local tangerine trees and gumming on the branches can be the primary basis for differentiation.

Keywords: *Citrus cachexia viroid*, indicator plant, Mexican lime, RT-PCR, stem pitting

مقدمه

استان مازندران از لحاظ سطح زیر کشت و میزان تولید مرکبات رتبه اول را دارد و از نظر اراضی باغی، رتبه چهارم را در بین سایر استان‌ها به خود اختصاص داده است. در مورد نارنگی با توجه به شرایط مطلوب اقلیمی و قابلیت تولید در واحد سطح در استان مازندران متوسط آن ۲۱،۲۱۶ کیلوگرم در هکتار برآورد شده است (Ahmadi et al., 2021). امکان تولید دو تا چند برابر وضعیت موجود، نشان دهنده وجود مشکلات مختلفی در مدیریت باغی این درختان است که یکی از مهمترین این عوامل خسارت ناشی از بیماری‌های ویروسی و ویروئیدی است. از عوامل ویروسی و ویروئیدی مهمی که تا کنون از مرکبات ایران گزارش گشته است می‌توان به ویروس‌های تریستزای مرکبات (*Citrus tristeza virus* Alavi et al., 2005)، پسروروز مرکبات (*Citrus psorosis virus* Falaki et al., 2012) و ویروئیدهای اگزوکورتیس (*Citrus exocortis viroid* Alavi et al., 2015) و کاکسیای مرکبات (*Citrus cachexia viroid* Alavi et al., 2015) اشاره نمود. از بین هفت گونه شناخته شده از ویروئیدها به‌عنوان عوامل بیمارگر مرکبات، *Hop stunt viroid* (Hsvd) عامل بیماری کاکسیا (Cachexia) به‌عنوان یکی از مهمترین عوامل خسارتزا در مرکبات در بین ویروئیدهای شناخته شده، معرفی گردیده است (Stackhouse et al., 2021, Semanchik., 1988). دو واریانت از این ویروئید، مولد علائم کاکسیا و بدون علائم کاکسیا تا کنون گزارش شده است (Palacio-Bielsa et al., 2004) علائم گزارش شده کاکسیا روی نارنگی و دورگ‌های آن در مقالات منتشر شده سایر کشورها شامل زردی، صمغ زدگی پوست، آبله تنه، زوال، کوتولگی و در مواردی کوتولگی به‌همراه مرگ درختان بوده (Hataya et al., 2017, Marquez-Molins et al., 2021) و در ایران شامل آبله تنه، صمغ زدگی پوست بوده و بروز حالت زوال نیز مبنای تفکیک خفیف یا شدید بودن جدایه‌های این ویروئید ذکر شده است (Vamenani et al., 2019, Banihashemian et al., 2015). در خصوص علل سرخشکیدگی و زوال درختان و ارتباط آن با

عوامل بیمارگر ویروسی و شبه ویروسی در باغات نارنگی که اغلب باغات بارده با درختان بالاتر از ۱۵ سال بوده و به‌نام نارنگی محلی (*Citrus unshiu Marcovitch*) در مازندران شناخته می‌شوند، پژوهش زیادی صورت نگرفته است و اطلاعاتی از وضعیت آلودگی این رقم حساس به ویروئید کاکسیا موجود نیست. ضمن این که در بین سویه‌های موجود احتمالی این ویروئید و شناسایی و تفکیک آنها بر اساس علائم روی درختان نارنگی محلی در باغات و گیاهان محک، به‌جز ارقام محک شناخته شده شامل بالنگ اتراک (*Citrus medica L.*) و لیموی شیرین فلسطینی (*Citrus limettioides Tanaka*)، نیز گزارشی وجود ندارد (Vamenani et al., 2019, Banihashemian et al., 2015). با توجه به‌وجود ناقلین طبیعی و همچنین احتمال انتقال مکانیکی با ابزار هرس برای عوامل بیمارگر ویروسی و ویروئیدی، احتمال وقوع آلودگی‌های چندگانه به دو یا تعدادی بیشتر از این عوامل در یک درخت میزبان را بالا برده و شناسایی علائم مختص به یک عامل بیمارگر ویروسی یا ویروئیدی را دشوار نموده است. لذا در صورت عدم دقت، شناسایی ویروئید روی درخت میزبان بر اساس علائم و تفکیک جدایه‌های آن در آزمون‌های بیولوژیکی و مولکولی را می‌تواند دچار خطا نماید (Roistacher, 1991; Venkataraman et al., 2021; Sanu, 2021) این پژوهش به‌منظور شناسایی و تفکیک بیولوژیکی بر اساس علائم مختص به سویه‌های ویروئید کاکسیا در باغات نارنگی محلی و همچنین یافتن گیاه یا گیاهان محکی که بتوانند برای جداسازی سویه‌های شدید و خفیف این ویروئید مورد استفاده قرار گیرند، انجام گرفت.

روش بررسی

نمونه برداری

در طی سال‌های ۱۳۹۷ تا ۱۴۰۰ باغات نارنگی محلی با پایه نارنج در سه منطقه مهم تولید مرکبات در شرق مازندران، شامل سه شهرستان قائمشهر، ساری و نکا بررسی شد. در هر شهرستان پنج

شد. (Almeyda-Leon *et al.*, 2007; Alvarado-Gomez *et al.*, 2000; Najar *et al.*, 2018)

استخراج و جداسازی ویروس‌های پسروروز و تریستزای مرکبات استخراج RNA کل با استفاده از کیت Sambio purification Kit صورت گرفت. آزمون RT-PCR بر اساس استفاده از آغازگرهای ویروس‌های مورد نظر ارائه شده در جدول شماره ۱ تریستزای مرکبات با روش RT-PCR ارزیابی شد (Falaki *et al.*, 2012) (Hoang *et al.*, 2004).

تفکیک سویه‌های ویروئید کاککسیا بر اساس نموده سازی روی درختان نارنگی محلی

علائم گزارش شده کاککسیا روی درختان باغی شامل صمغ زدگی پوست در محل پیوند، آبله تنه، کوتولگی و زوال و در مواردی مرگ درختان ذکر شده که مبنای تفکیک خفیف یا شدید بودن جدایه‌های این ویروئید ذکر شده است، ولی تلاش چندانی در مورد بررسی علائم روی سایر قسمت‌های درخت میزبان با توجه به نوع پایه و پیوندک و امکان تفکیک روی میزبان‌های محک مناسب صورت نگرفته است (Vamenani *et al.*, 2019; Marquez-Molins *et al.*, 2021; Banihashemian and Bani Hashemian, 2012; Hataya *et al.*, 2017) برای بررسی نوع علائم و اختلافات بین سویه‌های شناسایی شده، از محل پیوند و مناطق بالا و پایین محل پیوند و همچنین از شاخه‌های فرعی روی تنه درختان پوست برداری انجام شد. همچنین برگ‌های این درختان هم بررسی شد (Hull, 2002., Velazquez *et al.*, 2002).

باغ نارنگی محلی (*Citrus unshiu* Marcovitch) با مساحت بین یک تا یک و نیم هکتار و سن ۲۰ تا ۲۵ سال با فاصله حداقل دو کیلومتر از یکدیگر، بازدید و بر اساس علائم ضعف عمومی و اطمینان از عدم پوسیدگی تنه در محل پایه و پیوند، از ده درخت در هر باغ نمونه برداری (جمعاً ۵۰ نمونه از باغات هر شهرستان) و به آزمایشگاه منتقل شد. با توجه به حجم کار امکان بررسی پوسیدگی ریشه میسر نبود.

شناسایی ویروئیدهای کاککسیا و اگزوکورتیس

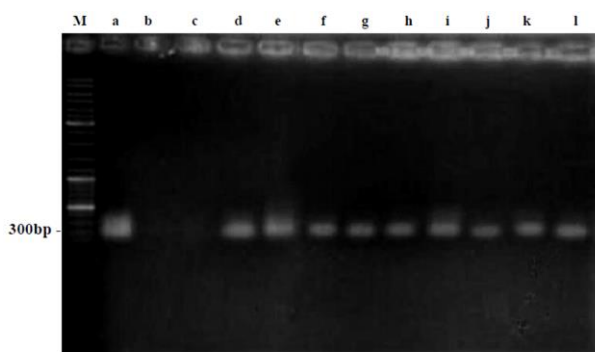
کلیه نمونه‌های جمع‌آوری شده با استفاده از یک روش خالص سازی، بر اساس ستون کروماتوگرافی سلولز CF-11، بررسی شد. استخراج نوکلئیک اسید از نمونه‌های جمع‌آوری شده از طریق روشی بر مبنای تلفیق دو روش معرفی شده در منابع (Dodds and Bar-Joseph, 1983; Morris and Dodds, 1979) انجام گرفت. خالص سازی در ستون حاوی پودر سلولز CF-11 انجام و رسوب ماده ژنتیکی ویروئید با افزودن اتانول خالص و استات سدیم صورت گرفت. ماهیت دورشته‌ای RNA حاصل، با عدم استفاده از آزمون هضم توسط آنزیم RNase DNase در حضور محلول نمک طعام ۰/۳ مولار و حلالیت در محلول LiCl تأیید شد (Dodds and Bar-Joseph, 1983). نوع ویروئیدها توسط RT-PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی (طبق جدول ۱) برای ویروئیدهای CEVd و CCaVd تعیین گردید (Almeyda-Leon *et al.*, 2007; Bernard and Duran-vila., 2006). در مرحله گسترش، از شیب حرارتی ۵۲ درجه سلسیوس با ۳۵ سیکل استفاده شد. سایر مراحل مطابق منبع مذکور انجام

جدول ۱- نام و توالی آغازگرهای ویروئیدهای اگزوکورتیس و کاککسیا و ویروس‌های تریستزا و پسروروز مورد استفاده در این پژوهش.

Table 1. Name and sequence of Primers of cachexia, exocortis, psorosis and tristeza in this study.

Refrences	Sequence 5' -3'	Primer name (Virus/viroid)
Bernard and Duran-Vila, 2006	GGGGCTCCTTCTCAGGTAAGTC GGGGCAACTCTCTCAGAATCC	CCaVd
Bernard and Duran-Vila, 2006	GGAAACCTGGAGGAAGTCGCCGGGATCCCTGAAGGA	CEVd
Hoang <i>et al.</i> , 2004	TTACCAATACCCTTAGAATTAT TTTGGACTGACGTCGTGTT	CTV
Apachi <i>et al.</i> , 2014	TCTGTTTTGTCAACACTCC GCTTCCTGGAAAAGCTGATG	CPV

مخلوط با ویروئید کاککسیا داشت. ۹ نمونه فقط به ویروئید کاککسیا آلوده بودند، شش نمونه آلوده به تریستزا و پسوروز، چهار نمونه به هر سه بیمارگر آلوده بوده و ۱۷ نمونه بدون آلودگی به موارد فوق بود (جدول ۲). ۹ نمونه مورد بررسی از درختان که فقط به ویروئید کاککسیا آلوده بودند، در الکتروفورز روی ژل آگارز یک درصد باندهای تکثیر شده در PCR از نظر اندازه شبیه به هم و مشابه سایر منابع و نزدیک به ۳۰۰ bp بود (شکل ۱).



شکل ۱- قطعه تکثیر شده از نه نمونه نوکلئیک اسید خالص سازی شده از درختان نارنگی محلی واجد علائم با آغازگر اختصاصی ویروئید کاککسیای مرکبات (Bernard and Duran-Vila, 2006)، M: مارکر نردبانی با فواصل ۱۰۰ جفت باز، a: شاهد آلوده، b: شاهد سالم، c: محلول واکنش PCR بدون نوکلئیک اسید خالص سازی شده، d: جدایه Q9، e: جدایه Q10، f: جدایه S6، g: جدایه S7، h: جدایه S9، i: جدایه N10، j: جدایه Q7، k: جدایه S8، l: جدایه N5.

Figure 1. RT-PCR detection of *Citrus cachexia viroid*, 100bp molecular marker M: DNA molecular marker 100bp, a: Positive control, b: negative control, c: PCR without DNA, d: Q9, e: Q10, f: S6, g: S7, h: S9, i: N10, j: Q7, k: S8, l: N5.

تفکیک سویه‌های ویروئید کاککسیا بر اساس علائم روی درختان نارنگی محلی

سویه‌های شدید Q2، Q10، S9، S7، S6 و N10 برگرفته از درختان نارنگی محلی آلوده به بیماری کاککسیا در باغات، با علائم شدید آبله دوکی تنه (Spindle stem pitting) در شکل شماره ۲ قابل مشاهده است، وجود صمغ در حفره‌های تنه با برجستگی‌های متقابل روی پوست در محل پیوند (شکل ۳)،

تفکیک سویه‌های ویروئید کاککسیا بر اساس نموده‌سازی روی گیاهان محک

نهال‌های بذری دو تا سه ساله بالنگ اترراگ (*Citrus medica* L) و تانجلو رقم مینولا (*Minneola tangelo*) به منظور بررسی بیشتر، ارقام مرکبات شامل نهال‌های بذری لیموترش مکزیکی (*Citrus aurantifolia*)، نارنج (*Citrus aurantium* L، سیترنج *Citrus sinensis* × *Poncirus trifoliata*)، سیتروملو، (*Trifoliata orange* * *Citrus paradise*)، پونسیروس، (*Poncirus trifoliata* Raf.)، نهال‌های پرتقال تامسون (*Citrus sinensis*) روی پایه نارنج، سیترنج و سیتروملو، نهال‌های نارنگی پیچ (*Minneola tangelo* × *Clementine mandarine*) و یونسی (*Citrus reticulata* cv. Ponkan) روی پایه نارنج، نارنگی وازه *MihoWase Satsuma mandarin* روی پایه پونسیروس و نهال‌های نارنگی کلماتین روی پایه سیترنج به عنوان گیاهان محک استفاده شد. از هر نهال سه تکرار برای هر نمونه جمع آوری شده به همراه یک نهال به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. برای هر نهال محک، سه قطعه از پوست هر یک از نمونه‌های جمع آوری شده، پیوند پوستی (Bark Grafting) شد. نهال‌ها سرزنی شده و برچسب مشخصات برای هر نهال الصاق شد. (Perez et al., 2000, Muracia et al., 2015, Roistacher, 1991, Velazquez et al., 2002). پس از انتقال به گلخانه قرنطینه (دمای گلخانه در شش ماهه اول سال ۳۵-۲۵ و شش ماهه دوم ۲۰-۱۰ درجه سلسیوس). نهال‌ها هر سه ماه از نظر علائم برگگی، علائم روی تنه و نحوه رشد و پس از ۱۸ ماه، نهال‌ها از نظر علائم برگگی، علائم روی تنه و زیر پوست و نحوه رشد بررسی و نتایج ثبت شد.

نتایج و بحث

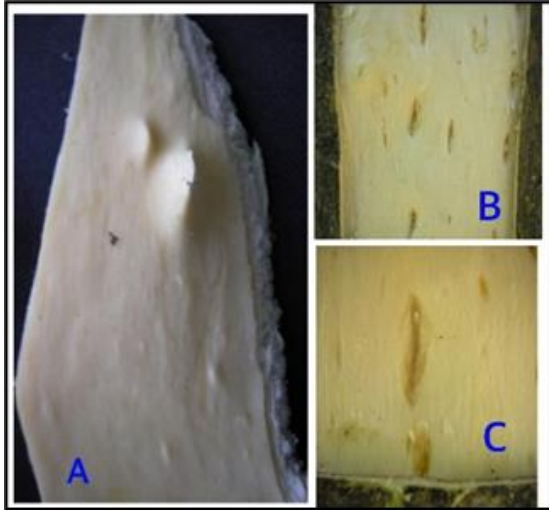
در بررسی مولکولی ۱۵۰ نمونه جمع‌آوری شده، ۶۳ نمونه آلوده به ویروس تریستزا بودند که تعداد ۳۰ نمونه از آنها آلودگی مخلوط با ویروئید کاککسیا داشت. از ۵۲ نمونه آلوده به ویروس پسوروز مرکبات، تعداد ۲۵ نمونه آلودگی

ویروئید نشان داد، بدین ترتیب که دوازده ماه پس از پیوند پوست نارنگی‌های محلی آلوده به هر یک از سویه‌های شدید Q2، Q10، S9، S7، S6 و N10 روی این گیاه محک، با برداشتن



شکل ۳- برجستگی داخل پوست نارنگی محلی بالای محل پیوند (A)، آبله دوکی شکل روی تنه همراه با صمغ زدگی در سویه‌های شدید ویروئید کاککسیای مرکبات (B,C)

Fig. 3. Bumps on the skin at the upper part of graft site in Tangerin (A), spindal stem pitting with gumming on trunk (B,C).



شکل ۴- لکه‌های صمغی در دیواره کامبیوم آبکش در محل پیوند نارنگی محلی در اثر آلودگی به سویه‌های شدید ویروئید کاککسیا (A) صمغ زدگی زیر پوست در شاخه‌های فرعی تنه نارنگی محلی در سویه‌های شدید (B) در مقایسه با بافت زیر پوست در سویه‌های خفیف (C) ویروئید کاککسیای مرکبات

Fig. 4. Spots resinous in the cambium wall in graft site in infected tangerine with sever straine of Citrus Cachexia (A), gumming under the skin of sever straine (B) compared with mild straine.

صمغ زدگی‌های نواری روی سطح چوب شاخه‌های فرعی (شکل ۲) و وجود لکه‌های صمغی در دیواره کامبیوم آبکش در محل پیوند (شکل ۴) شناسایی شد. سویه‌های Q7، S8 و N10 برگرفته از درختان آلوده با علائم خفیف آبله تنه (تعداد و اندازه کمتر از دیگر سویه‌ها)، فاقد دیگر علائم فوق‌الذکر بودند (شکل ۵). علائم مشاهده شده در باغات، به تفکیک سویه‌ها در جدول ۳ آمده است.

تفکیک سویه‌های ویروئید کاککسیا بر اساس دامنه میزبانی روی گیاهان محک

علائم مشاهده شده روی گیاهان محک، مطابق آنچه در منابع ذکر شده در بهترین زمان دوازده ماه پس از آلوده سازی (Alcantara-mendoza, et al., 2017) در جدول شماره ۴ ذکر شده است. در بالنگ اتراگ سوختگی یا نکروز و همچنین لکه‌های زرد رنگ روی حاشیه برگ‌ها در واکنش به آلودگی سویه‌های شدید ویروئید کاککسیای مرکبات مشاهده شد (شکل ۶). لیموی مکزیکی در واکنش به سویه‌های شدید ویروئید کاککسیای مرکبات علائم قابل توجه و تفکیک پذیر نسبت به سویه‌های خفیف این



شکل ۲- آبله‌های دوکی شکل و حفره ای روی تنه (A) و علائم stem pitting زیر پوست سویه شدید (B)، علائم آبله خفیف تنه زیر پوست سویه‌های شدید (C).

Fig. 2. Severe spindle stem pitting on trunk (A), stem pitting in sever strains(B), stem pitting in mild strains.

آلوده به هر یک از سویه‌های شدید ویروئید کاکسیسای مرکبات روی لیموی مکزیکی، لکه‌های مدور با حاشیه زرد در متن سبز روی برگها ظاهر شد که با گذشت زمان، تعداد آنها بیشتر شده و مشخص تر گردیدند و در برخی حاشیه این لکه‌ها شروع به نکروز شدن نمود (شکل ۷-C,D).

قطعه پوست پیوندی، صمغ زدگی شدیدی روی چوب تنه مشاهده گردید (شکل ۷-A,B). در طی این مدت، نهال‌های لیموی مکزیکی کم رشد شده و ریز شدن برگها همراه با زردی به صورت عمومی قابل مشاهده بود (شکل ۷-E). چهار ماه پس از پیوند پوست نارنگی محلی

جدول ۲- وضعیت آلودگی به بیماریهای ویروسی- ویروئیدی نمونه‌های جمع‌آوری شده از باغات نارنگی محلی در شرق استان مازندران

Table 2. Status of orchards based on infection by viroid and virus disease.

City	Orchards	Without infected	Mixture infected by psorosis and tristeza	Infected by cachexia	Infected by exocortis	Infected by psorosis	Infected by tristeza
Qaemshahr(Q)	1	8,5	9,1	7	-	4*,6	3,2*,10
	2	3	10*	-	-	9,7*,6*,2*	1,8*,5*,4*
	3	4	-	2	-	1*,5,9*,7	4,8,3,6*
	4	-	8,2	10	-	4*,3	5*,9,7,6*,1
	5	3	-	-	-	10,6,5,1*	8*,9,4*,28,7
Sari(S)	1	3	7	8	-	1,5*,4*	10*,9,6*,2
	2	-	-	7	-	10,2,1*	9,5,4*,8*,6*,3
	3	8,5	-	-	-	4*,7	10,9*,6,3*,1*,2
	4	7	2,5*	9	-	3,1	10*,8,6*,4*
	5	7	-	6	-	10*,4,3	9,8,5*,1*,2
Neka(N)	1	4,3,2	-	-	-	10*,9*,8,6*,1	7,5*
	2	-	-	5	-	10,6,3*,2*,1	9*,8,7*,4
	3	6,3	7	-	-	10,9*,4	8,5,2*,1
	4	1	-	-	-	8*,7*,6,5*,2	10*,9*,4,3
	5	9	-	10	-	7,8*,4,3*,1	6,5,2

(* Infected by cachexia), (* آلودگی مشترک با کاکسیسای)

جدول ۳- علائم مشاهده شده در باغات مرکبات (نارنگی محلی روی پایه نارنج) به تفکیک جدایه‌ها.

Table 3. The symptoms of virus and viroids observed in the gardens (*Citrus unshiu* Marcovitch on *Citrus aurantium* root stucks).

Strain	Stem pitting on root stuck	Symptoms of leave	Decline	gum in trunk cavities	Gum under the skin	Gum in stem pitting	Spindall stem pitting Depth <3mm Length <4mm
Q2	-	-	+	+	+	+	+
Q7	-	-	-	-	-	-	-
Q10	-	-	+	+	+	+	+
S9	-	-	+	+	+	+	+
S8	-	-	-	-	-	-	-
S7	-	-	+	+	+	+	+
S6	-	-	+	+	+	+	+
N10	-	-	+	+	+	+	+
N5	-	-	-	-	-	-	-

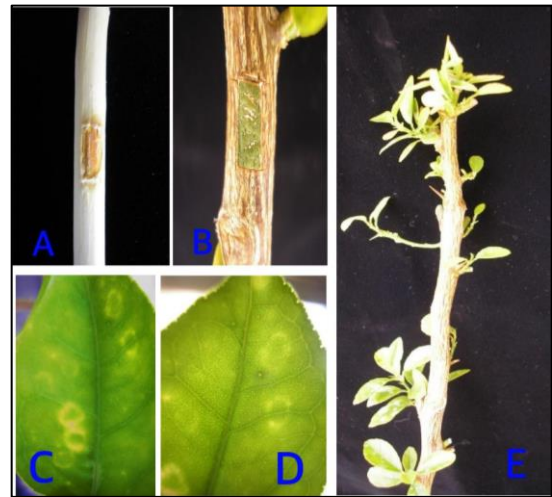
در این بررسی مشخص گردید که صرفاً بر اساس علائم آبله تنه روی نارنگی و دورگهای آن در خصوص آلودگی قطعی به هر یک از عوامل بیمارگر ویروئیدی یا ویروسی نمیتوان قضاوت نمود (Alcántara- Malfitano, M., et al 2005), Mendoza et al., 2017. همچنین مشخص گردید که آلودگی- های مخلوط ویروسی- ویروئیدی در سطح باغات نارنگی محلی استان مازندران گسترش یافته، لذا مشاهده علائم کم رشدی یا زوال و نسبت دادن آن به شدیدبودن سویه آلوده کننده‌ی آن نیز از دقت کافی برخوردار نیست.

(Eiras, M., et al., 2013, Alcántara-Mendoza et al., 2017) . آلودگی‌های مخلوط تاثیر قابل توجهی روی علائم ایجاد شده در میزبان داشته، موجب بروز تنوع علائم شده و در مواردی تشدید کننده علائم بالاخص زوال درختان بوده و توانایی تشخیص نوع بیماری بر اساس علائم روی میزبان را مختل می نماید. شباهت علائم در دو یا چند بیمارگر نیز می تواند دقت در چنین مطالعاتی را تحت تاثیر قرار دهد. به عنوان مثال ویروس تریستزای مرکبات روی پایه نارنج با پیوندک‌های ارقام مختلفی از مرکبات می تواند علائم مشابه با ویروئید کاککسیا مانند زوال و آبله تنه در محل پیوند یا در بالا و پایین آن ایجاد کند (Alavi et al., 2005) و در صورت عدم بررسی همزمان آلودگی به این دو بیمارگر و تمرکز تنها روی یک عامل، می تواند پژوهشگر را دچار خطا نماید. با توجه به موارد اشاره شده فوق الذکر، گزارش‌هایی که در گذشته صرفاً بر اساس علائم روی میزبان از وجود بیمارگرهای ویروسی و ویروئیدی منتشر شده (Roistacher, 1991)، از دقت کافی برخوردار نبوده و بررسی‌های توأمان بیولوژیکی و مولکولی را الزامی می نماید. اطمینان از عدم آلودگی هم‌زمان یک میزبان به دو یا چند عامل بیمارگر ویروسی یا شبه ویروسی، قبل از انجام سایر مطالعات بیولوژیکی و مولکولی، در آغاز هر گونه مطالعات در مورد هر یک از اینگونه عوامل بیمارگر بایستی حاصل گردد. اختلافات در شدت و ضعف علائم زوال در درختان نارنگی محلی می تواند وابسته به زمان آلودگی به هر یک از این



شکل ۶- نکروز و ظهور لکه‌های زرد رنگ در حاشیه برگ بالنگ اتراک در واکنش به آلودگی سویه‌های شدید Q2، Q10، S9، S7، S6 و N10 ویروئید کاککسیای مرکبات.

Fig. 6. Necrosis and yellow spots on the margins leaves of Etrog citron, inoculation with milde strain of *Cachexia viroid* (Q2,Q10,S6,S7,S9, N10).



شکل ۷- صمغ زدگی زیر محل پیوند پوست نارنگی آلوده به سویه‌های شدید Q2، Q10، S9، S7، S6 و N10 ویروئید کاککسیای مرکبات روی تنه لیموی مکزیکی پس از برداشتن پوست پیوند شده، ۱۲ ماه بعد از پیوند (A,B)، ظهور لکه‌هایی با حاشیه زرد و در برخی موارد نکروز روی برگ لیمو مکزیکی مایه کوبی شده با سویه‌های شدید Q2، Q10، S9، S7، S6 و N10 ویروئید کاککسیای مرکبات، از ۴ تا دوازده ماه پس از پیوند (C,D)، کند رشدی، ریز برگ و زردی عمومی روی لیمو مکزیکی آلوده شده به سویه‌های شدید Q2، Q10، S9، S7، S6 و N10 ویروئید کاککسیای مرکبات، ۱۲ ماه پس از پیوند (E).

Fig. 7. Gumming under the skin of the grafting site of Mexican lime, inoculated with severe strain of *Cachexia viroid* (Q2، Q10، S9، S7، S7، S6، N10) 12 months after bark-grafting (A,B), spots with yellow to necrosis margin on the leaf of Mexican lime, inoculate with sever strain of *Cachexia viroid* (Q2، Q10، S9، S7، S7، S6، N10) 4- 12 months after bark grafting (C,D) fine leave, decreasing growth and general yellowing in Mexican lime, inoculated with severe strain of *Cachexia viroid* (Q2، Q10، S9، S7، S7، S6، N10) 12 months after bark grafting (E)

بیشتر برای شناسایی ویروئید اگزوکورتیس کاربرد داشته است (Alcántara-Mendoza *et al.*, 2017 Pérez, R. *et al.*, 2000) و در خصوص ویروئید کاکسیای مرکبات، علائم تفکیک کننده ای بین سویه‌های شدید و خفیف این ویروئید روی این میزبان تا کنون ارائه نشده است (Belabess *et al.*, 2021). در مطالعه حاضر با بررسی ۱۳ رقم از گیاهان محک با مایه کوبی با سویه‌های شدید و خفیف ویروئید کاکسیای مرکبات، بهترین میزبان لیموی مکزیکی بود که با ایجاد علائم اختصاصی برای سویه‌های شدید، می‌تواند به خوبی آنها را از سویه‌های خفیف این ویروئید تفکیک نماید. آنچنان که در بررسی حاضر مشخص شد، تفکیک سویه‌های شدید ویروئید کاکسیای مرکبات از سویه‌های خفیف، بر اساس علائم روی درختان نارنگی محلی نیز امکان پذیر بود و اندازه و شکل آبله‌های روی تنه در محل پیوند و همچنین صمغ زدگی زیر پوست در شاخه‌های فرعی، توانست مبنای اولیه تفکیک آنها از یکدیگر قرار گیرد (جدول ۴).

عوامل، میزان حساسیت میزبان و شدت بیماریزایی هر یک از این عوامل بیمارگر باشد. تاکنون گیاه محک مناسبی برای تفکیک بین سویه‌های شدید و خفیف ویروئید کاکسیای مرکبات معرفی نگردیده است (Alcántara-Mendoza *et al.*, 2017). Belabess *et al.*, 2021. ذکر این نکته نیز ضروری است که برخی عوامل بیمارگر قارچی (Almeyda *et al.*, 2019) یا نماتی (Verdejo-lucas *et al.*, 2004) نیز می‌توانند علائم زوال را در درختان مرکبات مانند نارنگی محلی ایجاد کنند. درختی که در اثر یک یا چند عامل پوسیدگی ریشه یا طوقه دچار زوال می‌گردد، ممکن است همزمان نیز به یک یا چند عامل بیمارگر ویروسی یا ویروئیدی مبتلا باشد. میزبان محک عمومی برای ویروئیدهای مرکبات، بالنگ اتراک بوده که برای ویروئید اگزوکورتیس و کاکسیای مرکبات مورد استفاده بوده است (Eiras *et al.*, 2013, Roistacher, 2004)، اما علائم شاخصی مانند ریزبرگی، قاشقی شدن برگ‌ها و نکروز شدید دمبرگ

جدول ۴- علائم روی گیاهان محک مایه کوبی شده با سویه‌های شدید و خفیف ویروئید کاکسیای مرکبات.

Table 4. The symptoms of indicator plants incubated with sever and mild strains of citrus cachexia viroid.

Indicator plants	Sever strains Q2, Q10, S9, S7, S6, N10	Mild strains Q7, S8 and N8
Mexican lime (<i>Citrus aurantifolia</i>)	Decreased severe growth, fine leaf and yellow annular spot with a margin of necrosis in the leaf text, gingivitis below the skin graft site	General jaundice of seedlings
Etrog citron (<i>Citrus medica</i> L),	Decreased growth, necrosis, and yellow spots on the margins of the leaves	Decreased growth
Poncirus (<i>Poncirus trifolita</i> Raf.)	Yellowing of leaf margins	Yellowing of leaf margins
sour orange (<i>Citrus aurantium</i> L.	Yellowing of leaf margins	Yellowing of leaf margins
Citrumelo (<i>Trifoliate orange</i> × <i>Citrus paradise</i>)	Yellowing of leaf margins	-
Citrange (<i>Citrus sinensis</i> × <i>Poncirus trifoliate</i>)	Yellowing of leaf margins	Yellowing of leaf margins
Thomson on an orange rootstuck	Yellowing of the end of the leaf	-
Thomson on a citrange rootstuck	Yellowing of the ends and margins of the leaves	-
Thomson on a citrumelo rootstuck	Yellowing of the ends and margins of the leaves	Yellowing of the ends and margins of the leaves
Minneola tangelo on sour orange rootstuck	Yellowing of the end of the leaf	Yellowing of the end of the leaf
Ponkan on sour orange rootstuck	Yellowing of the end of the leaf	-
Page on sour orange rootstuck	General jaundice of seedlings	-
Clementine on sour orange rootstuck base	General jaundice of seedlings	General jaundice of seedlings

سپاسگزاری

کلینیک گیاه‌پزشکی دکتر علوی مازندران و مرکز تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی استان مازندران، برای در اختیار قراردادن امکانات آزمایشگاهی و گلخانه‌ای، اعلام می‌دارند.

پروژه حاضر در قالب پایان نامه دکتری بیماری شناسی گیاهی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به انجام رسیده است. نویسندگان مراتب سپاس و تشکر خود را از

References

- ACHACHI, A., E. AIT BARKA and M. IBRIZ, 2014. Recent advances in Citrus psorosis virus. *VirusDis.* 25(3), 261–276
- AHMADI, K., H.R. EBADZADE., HATAMI,F., SH. MOHAMADNIA, R. TAGHANI and M.A. KALANTARI, 2021. Agricultural statistic (horticultural products), information and communication technology center of the ministry of jihad agriculture, pp110-121 (in Farsi with English summary)
- ALAVI, V., B. KHATABI and G. HOSSEINI SALEKDEH, 2005. Comparison of biologically distinct isolates of *Citrus tristeza virus* from Iran using major coat protein sequences. *Australasian Plant Pathology*, No. 34: 577-582. (in Farsi with English summary)
- ALAVI, S.M., A. AHOUNMANESH, H.A. RAHIMIAN, 2007. Nucleotide Sequence Of *Hop Stunt Viroid* cDNA From Cachexia infected Citrus Plants In Mazandaran Province. *Iranian Journal of Plant Pathology*, No. 43:1(69): 49-64.
- ALAVI, S.V., P. TEYMURI, 2017. Detection of citrus viroids by CF-11 nucleic acid extraction method. *Applied Entomology and Phytopathology*, No.85 (1): 77-86
- ALCANTARA-MENDOZA, S.; S. ALCANTARA-MENDOZA; O GARCÍA-RUBIO; V.H.; CAMBRÓN-SAN-DOVAL, D. CAMBRÓN-SAN-DOVAL, C. CAMBRÓN-SAN-DOVAL, 2017. Characterization of *Citrus Exocortis viroid* in different conditions of indexing. *Mexican Journal of Phytopathology*, No. 35: 284-303.
- ALMEYDA, F., L., MARCIO RODRIGUES, C. COELHO, 2019. The still underestimated Problem of Fungal diseases worldwide. *Frontiers in Microbiology*, No 34: 24-31
- ALMAYDA-LEON, I. H., M.A. ROCH-PENA, IRACHETACARDENAS, F. ORONA-STERO and C.J. KHALKE, 2007. A simple method for the multiple detection of citrus viroids. *Agrociencia*. No. 41: 87-93
- APARI-ISAIA, T., A. KYRIAKOU, L. PAPAYIANNIS, D. TSALTAS, S. GREGORIOU and I. PSALTIS, 2008. Rapid in vitro microindexing of viroids in citrus. *Plant Pathology.*, No. 57, 348-353
- ALVARADO-GOMEZ, O.G., M.A. ROCH-PENA, S. SILVA-VARA, J.P. MARTINEZ-SORIANO and R.F LEE, 2000. Citrus exocortis and citrus cachexia viroids in commercial groves of Tahiti lime in Mexico .15th. International Organization of Citrus Virologist Confrance USA: 289-293.
- BANI-HASHEMIAN, S.M., G. PENSABENE-BELLAVIA, N. DURAN-VILA and P. SERRA, 2015. Phloem restriction of viroids in three citrus hosts is overcome by grafting with Etrog citron: Potential involvement of a translocateable factor. *Journal of General Virology*, No. 96, 2405–2410.
- BERNARD, L. and DURAN-VILA, 2006. A novel RT-PCR approach for detection and characterization of citrus viroids. *Molecular and Cellular Probes*, No. 20(2): 105-13.
- EIRAS, M., S.R SILVA, E.S., STUCHI, S.A., CARVALHO and R.M., GARCÉZ, 2013. Identification and

- characterization of viroids in “Navelina ISA 315” sweet orange. *Tropical Plant Pathology*, No.38(1), 58-62.
- FALAKI, F.S.V. and ALAVI F., RAKHSHANDEROO, 2012. *Citrus Psorosis Virus*, causal agent of ring pattern disorder in Thomson Navel trees in east of Mazandaran. *Applied Entomology and Phytopathology*, No.80(2):161-172(in Farsi with English summary)
- HATAYA, T., T. TSUSHIMA and T. SANO, 2017. *Hop stunt viroid*. In: Hadidi, A., Randles, J., Flores, R. and Palukaitis, P. (Eds.), *Viroids and Satellites*. Cambridge: Academic Press-Elsevier, pp. 199–210.
- HULL, R. 2002. “Mathews plant virology” (4th edition). Academic press, SanDiego. 1001pp.
- HUANG, Z., P.A. RUNDELL, X. GUAN and C.A. POWELL, 2004. Detection and isolate differentiation of *Citrus tristeza virus* in infected field trees based on reverse transcription–polymerase chain reaction. *Plant Diseases*. 88:625-629.
- LOCONSOLEA, G., B. NUKET ÖNELGEK, RAYMOND, C. YOKOMID., RAIED ABOU KUBAA, A. VITO SAVINO and M. SAPONARI, 2013. Molecular.Rapid differentiation of *Citrus Hop stunt viroid* variants by real-time RT-PCR and high resolution melting analysis. *Molecular and Cellular Probes*, No. 27(5)
- MALFITANO, M.; M BARONE,.; N.; DURAN-VILA, D. ALIOTO, 2005. Indexing of viroids in citrus orchards of Campania, Southern Italy. *J. Plant Pathol.*, 87, 115-121-
- MARQUEZ-MOLINS, j., G. GOMEZ and V. PALLAS, 2021. Hop stunt viroid: A polyphagous pathogenic RNA that has shed light on viroid–host interactions. *Molecular Plant Pathology*. No. 22(2): 153–162.
- MORRIS, T.J. and J.A. DODDS, 1979. Isolation and analysis of double stranded RNA from virus-infected plant and fungal tissue .*Phytopathology*. No. 69: 854-858.
- MURCIA, N., S.M., BANI HASHEMIAN, P., SERRA, J.A PINA.and N.DURAN-VILA, 2015. Citrus viroids: Symptom expression and performance of Washington navel sweet orange trees grafted on Carrizo citrange. *Plant Disease*. 99:125-136.
- NAJAR .A, I. HAMDI , K., BEN MAHMOUD, 2018. Citrus viroids: Characterization, prevalence, distribution and struggle methods. *Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology*, No. 50(12), 3129-3137
- PALACIO-BIELSA, A., J. ROMERO-DURB´AN, and N. DURAN-VILA, 2004. Characterization of citrus HSVd isolates. *Archive of Virology*, No. 149: 537–552.
- PEREZ, R.; E. CORREA, N. DEL VALLE and O. OTERO, 2000. Reduced Indexing Time for Cachexia and Exocortis Diseases in Citrus. In *Proceedings of the Fourteenth International Organization of Citrus Virologists Conference*; California.386-387.
- ROISTACHER. C.N., 1991. *Graft-Transmissible Diseases of Citrus* . FAO: Rom .286pp.
- FLORES, R., HERNANDES, C., MARTINEZDE-ALBA, A., DAROS, A. and DISERIO, F. 2005. Viroid and viroid-host interaction. *Annual Review of Phytopathology*, No. 43: 117-139.
- ROISTACHER, C.N., 2007. Diagnosis and management of virus and virus like diseases of Citrus. In *Diseases of Fruits and Vegetables*, No.1:109-189.
- SANO TERUO, 2021. Progress in 50 years of viroid research—Molecular structure, pathogenicity, and host adaptation. *Proceeding pf the Japan Academi. Series B*, No. 97(7): 371-401.
- SEMANCIK, J.S. and C.N. ROISTACHER, 1988. A new viroid is the causal agent of the citrus Cachexia disease. *Virology*, No. 10: 125-135.
- SERRA, P., S. GAGO and N. DURAN-VILA, 2008. A single nucleotide change in *Hop Stunt Viroid* modulates citrus cachexia symptoms. *Virus Research*, 138(1-2), 130-134
- STACKHOUSE, J.E., L. OLIVERJ, WILLIAMS-WOODWARD and M.E. ALI, 2021. First Report of *Hop Stunt Viroid* Infecting Citrus Trees in Georgia, USA. *Plant Disease*, No. 105:515.
- SU, X., S. FU, Y. QIAN, Y. XU and X. ZHOU, 2015. Identification of *Hop Stunt Viroid* infecting Citrus limon in China using small RNAs deep sequenc-ing approach. *Journal of Virology*, NO. 12: 1–5.

- VAMENANI, R., H. RAHIMIAN, S.M. ALAVI, A. PAKDIN PARIZI and T. MIRZA RAZZAZ, 2019. Genetic diversity of *Hop Stunt Viroid* from symptomatic and a-symptomatic citrus trees in Iran. *Journal of Phytopathology*, No. 167, 484–489
- VELAZQUEZ, K., M. SOTO, R. PEREZ, J. PEREZ, M.D. RODRÍGUEZ and N. DURAN-VILA, 2002. Biological and molecular characterization of two isolates of Citrus viroids recovered from Cuban plantations. *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings, USA*. No. 15(15), 258-263.
- VENKATARAMAN, S., U. BADAR, E. SHOEB, G. HASHIM, M. ABOUHAIIDAR and H. HEFFERON, 2021. An Inside Look into Biological Miniatures: Molecular Mechanisms of Viroids. *Journal of Molecular Science*, No. 22(6): 2795..
- VERDEJO-LUCAS, S., M.V. MCKENRY, 2004. Management of the Citrus Nematode, *Tylenchulus semipenetrans*. *Journal of Nematology*, No. 36(4): 424-32.